

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION  
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 03 mai 2000 (03.05.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02145	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BIF 22038 PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 09 septembre 1999 (09.09.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 10 septembre 1998 (10.09.98)
Déposant MONTERO JULIAN, Félix, A. etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

06 avril 2000 (06.04.00)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection  a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombelettes 1211 Genève 20, Suisse  no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé  Diana Nissen  no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
**Image Problems Mailbox.**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>G01N 33/68, 33/566, C07K 16/28</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/16103</b> (43) Date de publication internationale: <b>23 mars 2000 (23.03.00)</b>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR99/02145</b></p> <p>(22) Date de dépôt international: <b>9 septembre 1999 (09.09.99)</b></p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/11456 10 septembre 1998 (10.09.98) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): <b>IMMUNOTECH [FR/FR]; 130, avenue De-Lattre-de-Tassigny, B.P. 177, F-13276 Marseille Cedex 9 (FR).</b></p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): <b>MONTERO JULIAN, Félix, A. [FR/FR]; 6, rue Marie Louise, Le Marie Louise Bât C, F-13008 Marseille (FR). MOREL MONTERO, Anne, M. [FR/FR]; 6, rue Marie Louise, Le Marie Louise Bât C, F-13008 Marseille (FR). BRAILLY, Hervé [FR/FR]; l'Amandière Le Clos, F-13360 Roquevaire (FR). DELAAGE, Michel [FR/FR]; 16 rue Adophe Thiers, F-13001 Marseille (FR).</b></p> <p>(74) Mandataire: <b>RINUY, SANTARELLI; 14, avenue de la Grande Armée, Boîte postale 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).</b></p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: <b>METHOD FOR DETECTING OR QUANTIFYING BASOPHILS AND EOSINOPHILS</b></p> <p>(54) Titre: <b>PROCEDE DE DETECTION OU DE QUANTIFICATION DES BASOPHILES ET DES EOSINOPHILES</b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method for detecting or quantifying eosinophils and basophils, which consists in contacting a sample possibly containing said eosinophils or basophils with an IL-5 anti-receptor (alpha-chain) monoclonal antibody which does not interfere with IL-5 fixation to its receptor and does not inhibit the IL-5 biological activity to detect and, if required, to quantify eosinophils and basophils. The invention also concerns a kit for detecting or quantifying eosinophils or basophils and an anti-IL5R antibody.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Un procédé pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles, comprenant la mise en contact d'un échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles avec un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5 pour détecter et si désiré procéder à la quantification des éosinophiles et des basophiles, un kit pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles et un anticorps anti-RIL-5.</p>			
<p>ISOTYPIC CONTROL IgG1 PE Data: 142</p> <p>ANTI IL5R H17N-PE</p> <p>SSC-H</p> <p>FL2-H</p> <p>10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup></p> <p>10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup></p> <p>ISOTYPIC CONTROL IgG1 PE Data: 145</p> <p>EOSONOPHILS</p> <p>BASOPHILS</p> <p>SSC-H</p> <p>FL2-H</p> <p>10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup></p> <p>10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup></p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MR	Mauritanie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun			PT	Portugal		
CN	Chine	KR	République de Corée	RO	Roumanie		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SE	Suède		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapour		
EE	Estonie	LR	Libéria				

Procédé de détection ou de quantification des basophiles et des éosinophiles

La présente demande concerne un nouveau procédé de détection ou de quantification des basophiles et des éosinophiles chez des sujets sains ou malades, les procédés de préparation des réactifs nécessaires et leur mise en oeuvre notamment sous forme de kits.

L'étude des éosinophiles et des basophiles est difficile à cause du très faible nombre de ces cellules dans le sang, soit, respectivement, de 1 à 3% et moins de 1%. Cependant, leur nombre peut augmenter de manière importante dans certains états pathologiques tels que les infections parasitaires, les états allergiques, asthmatiques ou certaines leucémies.

Il a été démontré que les éosinophiles jouent un rôle très important dans l'asthme allergique chronique. Les éosinophiles infiltrent les voies respiratoires où ils peuvent être activés et dégranuler. La libération du contenu granulaire, enzymes et protéines basiques, cause un dommage à l'épithélium bronchique. Certains rapports font aussi mention de dysfonctionnements des éosinophiles.

Le pontage des IgE spécifiques, présentes sur les basophiles, par différents allergènes, tels que les pneumallergènes, venins, protéines alimentaires ou médicaments peut entraîner la libération des médiateurs contenus dans les granules ou néoformés et capables d'induire un choc anaphylactique.

Il est donc important, pour connaître l'état d'un sujet et apprécier sa susceptibilité aux agents exogènes, de compter les éosinophiles et basophiles et de mesurer la proportion de ceux qui sont activables par tel ou tel agent.

Les méthodes de comptage des basophiles et des éosinophiles sont basées sur la coloration des granules (comptage manuel) avec, par exemple, du bleu d'ortho-toluidine pour les basophiles et de l'éosine pour les éosinophiles, sur leur taille et leur granulométrie ou sur un immunophénotypage différentiel de leur surface cellulaire. Ce sont des méthodes lourdes, consommatrices de temps, et peu spécifiques. Elles possèdent de grandes incertitudes et des erreurs statistiques importantes à cause du faible effectif de ces types cellulaires. D'autre part, la plupart de ces méthodes ne permet pas d'analyser le degré d'activation de ces cellules.

Pour toutes ces raisons, il serait souhaitable de disposer de produits et de procédés permettant de détecter et quantifier plus spécifiquement les éosinophiles et les basophiles, activés ou non.

Différents procédés, utilisant un cytomètre de flux, ont été décrits pour la détection des éosinophiles et des basophiles (voir par exemple Nakagawa, et al., (1981) Allergy, 36;pp. 39-47 ; Gane, et al., (1995) Cytometry 19;pp. 361-365 ; Hübl, et al., (1996) J. Clin. Lab. Analysis. 10, 177-183).

Un des principaux problèmes rencontrés lors de l'étude par cytométrie de flux des basophiles et des éosinophiles, est la séparation nette entre les cellules positives et les cellules négatives. Certains auteurs utilisent une caractéristique remarquable des éosinophiles, leur autofluorescence, pour les identifier plus précisément. Cependant, certains échantillons cliniques présentent une autofluorescence très élevée des monocytes, neutrophiles et lymphocytes. Il faut aussi souligner ici la grande variabilité de la granulométrie des éosinophiles, ce qui se traduit par un étalement de la zone du diagramme de dispersion (répartition en fonction de la taille et de la granulométrie) correspondant à ces cellules. Sur le diagramme de dispersion, les basophiles sont situés à la frontière entre les lymphocytes et les monocytes.

Les leucocytes expriment à leur surface des protéines caractérisées en CDs (Cluster Differentiation) par des groupes d'anticorps qui les reconnaissent. L'expression de plusieurs CDs sur une même cellule peut permettre de la caractériser. Un même CD peut être exprimé sur différents types cellulaires. C'est pourquoi la plupart des procédés par cytométrie de flux utilisent des mélanges d'anticorps reconnaissant plusieurs de ces CDs comme marqueurs des basophiles ou des éosinophiles.

Par exemple, l'utilisation de deux mélanges d'anticorps, anti-CD2, anti-CD14, anti-CD16 et anti-CD19 d'une part et anti-CD32, anti-CD25, anti-IgG1 et anti-IgG4 d'autre part, permet de détecter les basophiles au cytofluorimètre en flux. Les anticorps anti-CD2 mettent en évidence les cellules T, les anticorps anti-CD19 permettent de détecter les cellules B et les anticorps anti-CD14 détectent principalement les monocytes mais aussi les granulocytes. Le CD16, récepteur de type III des IgG, est exprimé sur les neutrophiles,

certaines cellules T (NK) et sur les monocytes. Le CD32, récepteur de type II des IgG, est exprimé sur les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes B. Le CD25 est un marqueur d'activation des cellules T et B ainsi qu'un marqueur d'activation des macrophages. Plusieurs de ces marqueurs sont partagés par 5 différents types de leucocytes. Les basophiles et les éosinophiles sont des populations minoritaires de leucocytes. C'est pourquoi la plupart des données sur les basophiles et les éosinophiles ont été obtenues à partir de cellules purifiées. Par exemple, les basophiles de sujets atteints de leucémie myéloïde 10 chronique ont pu être étudiés après plusieurs étapes de purification à l'aide d'anticorps monoclonaux puis lyse des globules rouges par le complément. Cependant, ce procédé est impraticable en routine car il est long et nécessite un grand volume de sang.

D'autres procédés pour la détection des basophiles utilisent un anticorps anti-IgE ou un anticorps anti-récepteur de haute affinité pour les IgE. 15 Mais ces procédés ne permettent pas une identification claire des basophiles car de faibles quantités de récepteur de haute affinité pour les IgE ont été mises en évidence sur les monocytes et les éosinophiles et les cellules B peuvent porter des IgE à leur surface. D'autre part, le pontage des IgE ou de leurs récepteurs à la surface des basophiles, par les anticorps utilisés comme 20 sonde, peut entraîner une activation cellulaire modifiant les propriétés de la membrane. Il a été démontré que l'activation des basophiles par un allergène induit une diminution de la liaison d'un anticorps anti-IgE.

Il serait donc souhaitable de pouvoir facilement et sans risque d'erreur compter les éosinophiles et basophiles, même au milieu des autres 25 populations cellulaires du sang humain et de mesurer la proportion de ceux qui sont activables par tel ou tel agent.

En réponse au problème du diagnostic et du traitement de maladies telles que l'asthme bronchique chronique ou la dermatite atopique, EP-A-0 811 691 propose des anticorps de divers types, monoclonaux, humanisés etc. 30 dirigés contre la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'interleukine-5 bloquant l'activité de cette cytokine. Il propose aussi un procédé de détection des éosinophiles. Mais l'utilisation d'anticorps neutralisant l'activité biologique de l'IL-5 donne des

résultats décevants, par analyse en cytométrie de flux. Le signal spécifique obtenu sur des éosinophiles, même purifiés, ne se distingue pas du signal obtenu avec un anticorps de contrôle (bruit de fond).

Lors de la caractérisation d'un groupe d'anticorps monoclonaux  
5 dirigés contre le récepteur de l'interleukine-5 (RIL-5), la demanderesse a découvert que, de manière surprenante, les basophiles et les éosinophiles pouvaient, au milieu des autres populations cellulaires du sang humain ou animal, être détectés isolément et conjointement à l'aide de certains anticorps spécifiques de la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-5 et que l'on  
10 pouvait, si désiré, en plus compter ces mêmes cellules. La demanderesse a montré par bioessai sur cellules TF1, dépendantes de l'IL5 pour leur survie, que ces anticorps sélectionnés n'inhibaient pas la croissance de ces cellules.

D'autre part, la demanderesse a aussi montré que le récepteur lié à ces anticorps immobilisé sur phase solide est toujours capable de fixer l'IL5  
15 marquée.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet un procédé pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles avec un anticorps  
20 monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5 pour détecter et si désiré procéder à la quantification des éosinophiles et des basophiles.

L'invention utilise donc un anticorps monoclonal anti-récepteur de  
25 l'IL-5 (chaîne alpha) et l'expression de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-5 comme marqueur spécifique des éosinophiles et des basophiles. On a observé que ce marquage était spécifique de ces cellules sanguines et qu'aucune des cellules B, T, monocytes ou neutrophiles n'était marquée.

Ces anticorps sont donc utilisables pour le comptage des basophiles  
30 et des éosinophiles en toutes circonstances avec exactitude et précision.

L'échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles peut être par exemple un prélèvement sanguin provenant notamment d'un sujet malade, de préférence allergique ou parasité.

Selon le procédé ci-dessus décrit, l'anticorps monoclonal anti-5 récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5.

L'absence d'inhibition de l'activité biologique de l'IL-5 peut être montrée par bioessai sur cellules TF1, dépendantes de l'IL5 pour leur survie, les anticorps selon l'invention n'inhibant pas la croissance de ces cellules TF1.

10 Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit, l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec les IgE. L'on entend par « qui n'interfère pas avec les IgE» un anticorps qui n'empêche pas la liaison d'un allergène ou d'un autre anticorps anti-IgE, à ces IgE de surface .

15 Dans encore d'autres conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit, l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles. L'on entend par « qui n'interfère pas avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles» un anticorps qui par sa liaison à la surface de 20 la cellule, n'induit pas ou n'inhibe pas l'apparition d'un marqueur d'activation de surface des basophiles ou des éosinophiles.

Dans toujours d'autres conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit, la détection et si désiré la quantification des éosinophiles et des basophiles utilise un cytomètre de flux ou à balayage 25 optique.

Les basophiles humains expriment à leur surface des marqueurs tels que les CD11, CD13, CD18, CD26, CD31, CD32, CD33, CD40, CD43, CD44, CD45, CD49d, CD54 et les éosinophiles expriment à leur surface les CD15, CD32, CD44, CD49d, CD52, CD65, CD66, CD67. Par contre ni les basophiles, 30 ni les éosinophiles n'expriment les CD3, CD14, CD16, CD19. Ces listes de marqueurs ne sont pas exhaustives.

C'est pourquoi la présente demande a aussi pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que en outre l'on met en contact l'échantillon avec un ou de préférence plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres marqueurs permettant d'exclure les types cellulaires autres que les 5 éosinophiles ou les basophiles. Ainsi on peut discriminer les lymphocytes, monocytes et neutrophiles des éosinophiles et basophiles.

On utilise donc des marqueurs d'exclusion pour améliorer encore la précision du comptage en excluant les événements erratiques. La présente demande a notamment pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que 10 les autres anticorps monoclonaux sont dirigés contre les marqueurs CD3, CD16 et CD19 qui permettent d'exclure les événements erratiques.

L'invention permet la détection et la quantification spécifique des basophiles et des éosinophiles activés ou non activés. Il a été démontré récemment que le CD63, protéine lysosomale de la famille du téraspan et 15 initialement décrite comme marqueur d'activation des plaquettes, était également présent dans les granules des basophiles et neutrophiles. L'expression du CD63 à la surface cellulaire est dépendante du calcium. Lors de l'activation des basophiles, le CD63 exprimé à la surface peut être reconnu par un anticorps spécifique. L'intensité du marquage est fonction du nombre de 20 cellules activées.

C'est pourquoi la présente demande a encore pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des basophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs 25 d'activation des basophiles et notamment contre l'antigène CD 63.

De même, la présente demande a encore pour objet un procédé ci-dessus caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des éosinophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs 30 d'activation des éosinophiles et notamment contre l'antigène CD 69.

De plus la détection et le comptage des basophiles et des éosinophiles séparément est possible dès lors que l'on dispose d'un moyen additionnel de discrimination tel que

- la diffusion de la lumière dans les cytomètres en flux où les 5 éosinophiles se distinguent des basophiles par une valeur beaucoup plus élevée de la diffusion latérale (side scatter),

- l'activité peroxydaseque propre aux éosinophiles que l'on révèle par utilisation de substrats précipitants comme le DAB (diamino benzidine) ou fluorescents comme le diacétate de dichlorofluorescéine, substrat non-10 fluorescent transformé en 2',7'-dichlorofluorescéine hautement fluorescente.

La présente demande a encore pour objet un anticorps anti-RIL-5 caractérisé par :

- l'absence d'interférence avec la fixation de l'IL5 à son récepteur  
- l'absence d'interférence avec les IgE  
15 - l'absence d'interférence avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles  
- l'absence d'inhibition de l'activité biologique de l'IL-5.

Une réalisation avantageuse de l'invention consiste en l'utilisation d'un mélange d'anticorps dirigés d'une part contre le RIL-5, avec ou sans 20 marqueurs "spécifiques" des lymphocytes T et B, cellules NK, monocytes et neutrophiles et, si l'on s'intéresse aux éosinophiles ou basophiles activés, d'autre part un marqueur d'activation de basophiles et des éosinophiles. Le marqueur d'activation cellulaire peut être un anticorps spécifique d'une protéine apparaissant à la surface de la membrane cellulaire après activation ou la mise 25 en évidence d'une activité enzymatique oxydative. Celui-ci permet la mise en évidence et, éventuellement, la quantification de l'activation cellulaire.

C'est pourquoi la présente demande a aussi pour objet des kits ciblés pour différentes applications, lesdits kits ayant pour base un anticorps monoclonal anti-RIL-5, préférentiellement de souris, de rat ou de lapin, ou bien 30 modifié génétiquement et premièrement

un kit pour la détection ou la quantification des éosinophiles ou des basophiles contenant

- au moins un anticorps monoclonal anti-RIL-5 tel que défini ci-dessus couplé à un premier fluorochrome,

- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome,

5 ainsi qu'un kit pour la détection et la quantification des éosinophiles et des basophiles activés contenant

- au moins un anticorps monoclonal anti-RIL-5 tel que défini ci-dessus couplé à un premier fluorochrome,

10 - un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome et

- des anticorps dirigés contre des marqueurs d'activation et couplés à un troisième fluorochrome.

La présente demande a encore pour objet un kit ci-dessus caractérisé en ce qu'il renferme en outre un substrat spécifique de l'activité oxydative des 15 éosinophiles .

La présente demande a aussi pour objet un kit pour la détection ou la quantification de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles contenant

20 - au moins un anticorps monoclonal anti-RIL-5 tel que défini ci-dessus couplé à un premier fluorochrome

- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles conjugués à un second fluorochrome

- un substrat marqueur de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles.

25 Les conditions préférentielles de mise en oeuvre des procédés ci-dessus décrites s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus.

La présente demande a enfin pour objet un procédé, anticorps ou kit ci-dessus caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 30 est un anticorps de type IgG1 dont l'hybridome correspondant a été déposé à la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) sous le N° I-2068.

L'invention peut être appliquée dans le test, par les laboratoires cliniques et pharmaceutiques, de la réponse des basophiles ou des éosinophiles à différents types d'agents dégranulants (allergènes, substances chimiques, parasites, etc.), afin de réaliser un diagnostic ou un suivi de 5 désensibilisation, ou encore de mettre en évidence la capacité de nouvelles molécules à moduler la dégranulation des basophiles ou des éosinophiles et pour l'étude de pathologies allergiques, parasitaires et leucémiques.

Les exemples qui suivent illustrent la présente demande.

10

La figure 1 est l'illustration d'un "dot plot" obtenu avec l'anticorps monoclonal anti-RIL-5 H17N (B) et un contrôle isotypique (A) conjugués à la phycoérythrine. Les abscisses représentent l'intensité de fluorescence exprimée en échelle logarithmique et les ordonnées représentent la diffusion 15 latérale.

Les polygones marqués R4 et R5 représentent respectivement les basophiles et les éosinophiles.

Les figures 2A et 2B sont l'illustration d'un double marquage obtenu avec l'anticorps anti-RIL-5 conjugué à la phycoérythrine pour les basophiles et 20 les éosinophiles, respectivement. Les abscisses représentent la fluorescence émise par la fluorescéine (FITC) et les ordonnées la fluorescence émise par la phycoérythrine (PE).

Le "dot plot" de gauche représente le double marquage entre l'anti-RIL-5-PE et un anticorps spécifique d'un autre marqueur couplé au FITC. Le 25 "dot plot" de droite représente le marquage obtenu avec un contrôle isotypique et l'anti-RIL-5-PE.

Les marqueurs utilisés sont, de haut en bas, anti-CD16 (ce marqueur est présent sur les neutrophiles, les cellules NK, les cellules de Kuppfer et une sous population des macrophages), anti-CD49d (chaîne alpha 4 30 des intégrines exprimée sur les basophiles et les éosinophiles mais aussi sur les lymphocytes, monocytes et thymocytes).

La figure 3 est l'illustration d'un double marquage obtenu avec un anticorps anti-RIL-5 conjugué à la phycoérythrine en combinaison avec un mélange d'anticorps CD3, CD19, CD16, tous conjugués à la phycoérythrine-Cyanine 5 (PECy5). Le canal FL-1 correspond à la fluorescence émise par la fluorescéine, le canal FL-2 correspond à la fluorescence émise par la phycoérythrine et le canal FL-3 correspond à la fluorescence émise par la phycoérythrine Cyanine 5.

Le diagramme A correspond à la dispersion selon la taille et la granulométrie. On distingue la région R1 qui correspond aux lymphocytes, la 10 région R2 qui correspond aux monocytes et la région R3 qui correspond aux granulocytes.

Le diagramme B correspond à la fluorescence de l'anticorps anti-IL-5R-PE en fonction de la diffusion latérale, fonction de la taille cellulaire. R4 correspond aux basophiles et R5 correspond aux éosinophiles.

15 Le diagramme C représente la fluorescence du mélange d'anticorps anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, en fonction de la diffusion latérale. R6 correspond aux éosinophiles non marqués.

Le diagramme D représente la fluorescence du mélange d'anticorps antiCD3, anti-CD16, anti-CD19 et la fluorescence de l'anticorps anti-IL-5R-PE. 20 Les éosinophiles se projettent dans les régions R5 et R6. Seuls les événements présents en R5 et R6 sont pris en compte dans le diagramme D.

La figure 4 est l'illustration de la corrélation entre les pourcentages donnés par un hématimètre et le procédé de l'invention. Les abscisses représentent le pourcentage des éosinophiles (A) et le pourcentage des 25 basophiles (B) obtenus en cytométrie de flux et les ordonnées représentent le pourcentage des éosinophiles (A) et le pourcentage des basophiles (B) donnés par l'hématimètre.

Le graphique du haut correspond aux données obtenues sur les éosinophiles et le graphique du bas aux données obtenues sur les basophiles. 30 Les coefficients de corrélation sont données à l'intérieur de chaque graphe.

La figure 5 est l'illustration typique d'un résultat obtenu après activation des basophiles avec un anticorps anti-IgE.

Sur cette figure 5, le "dot plot" 1 représente la taille et la granulométrie des cellules du sang, le diagramme 2 représente le marquage obtenu avec l'anticorps anti-RIL-5-PE (diagramme similaire à celui présenté sur la figure 1), le diagramme 3 représente l'isolement des basophiles et le 5 nettoyage de la population des autres contaminants possibles, tels que les lymphocytes et les monocytes. Le diagramme 4 représente les basophiles.

La figure 5B représente 4 « dot plots » de basophiles activés. Chaque « dot plot » correspond à une stimulation de sang total par des concentrations décroissantes d'anti-IgE. Les abscisses représentent la fluorescence émise par la fluorescéine couplée à l'anticorps anti-CD63, et les ordonnées représentent la fluorescence émise par la phycoérythrine couplée à l'anticorps anti-RIL-5.

La figure 6 est l'illustration de la comparaison entre les pourcentages 15 des cellules CD63+IL5R+ et le pourcentage d'histamine libérée.

Chaque diagramme représente un donneur. Les symboles noirs représentent le % des cellules CD63+IL5R+ et les symboles blancs le pourcentage d'histamine libérée. Les abscisses représentent la concentration d'anti-IgE utilisée par la stimulation des basophiles exprimés en µg/ml et les 20 ordonnées représentent le pourcentage de basophiles exprimant CD63 ou le pourcentage d'histamine libéré.

La figure 7 est l'illustration de l'activation des éosinophiles par un ester de phorbol (PMA : phorbol myristate acétate). Les abscisses représentent la concentration de PMA ajouté et les ordonnées représentent le pourcentage 25 des éosinophiles exprimant la molécule CD69 ou CD63. Chaque diagramme représente un donneur différent.

#### **EXAMPLE I. Obtention des anticorps monoclonaux anti-RIL-5.**

30           1- Réactifs.

Les réactifs courants (sels, tampons, etc.) ont été achetés chez Merck, Darmstadt, Allemagne. Les réactifs de culture cellulaire proviennent de

Biowithhaker Virviers, Belgique et de Sigma, Saint-Louis, USA. Les anticorps monoclonaux anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD49d, anti-CD63, anti-CD69 conjugués au N-isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou au phycoérythrine Cyanine 5 (PECy5) et l'anticorps monoclonal anti-IgE clone 5 E124.2.8. sont des produits commerciaux obtenus chez Immunotech, Marseille, France.

## 2- Fusion

L'anticorps anti-RIL-5, clone H17N, a été obtenu après immunisation 10 de souris avec une forme soluble recombinante du RIL-5, protéine produite à partir d'un gène fusion RIL-5 – IL-2 et exprimée dans les cellules CHO, puis fusion des blastocytes avec les cellules de myélome X63, selon la technique classique décrite par Köhler et Milstein (1975, Nature 256, 495). La production d'anticorps a été ciblée par ELISA en utilisant des plaques recouvertes avec 15 soit la protéine hybride RIL-5-IL-2 soit avec l'IL-2. Les clones positifs sur les plaques recouvertes avec le RIL-5-IL-2 et négatifs sur les plaques recouvertes avec l'IL-2 ont été clonés par dilution limite. La sélection des anticorps s'effectue sur des cellules TF-1 en raison de leur capacité à reconnaître le RIL-5 en présence et en absence d'IL-5, critère selon la présente invention.

20 Parmi les anticorps monoclonaux sélectionnés, l'anticorps monoclonal anti-RIL-5, appelé H17N, présente une forte affinité pour l'antigène mais n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5. En conséquence, malgré la liaison de l'IL-5 à son récepteur aucune inhibition n'est observée. L'hybridome correspondant a été déposé à la Collection Nationale de Culture de Micro- 25 organismes (CNCM) à Paris le 3 septembre 1998 sous le N° I-2068. L'anticorps monoclonal anti-RIL-5, appelé H17N est de type IgG1.

## 3- Couplage à un marqueur fluorescent

Le couplage de l'anticorps anti-RIL-5 H17N à la phycoérythrine a été 30 réalisé selon le protocole décrit dans « Bioconjugate techniques » par G. Hermanson, Academic Press, 1996.

**EXEMPLE 2. Analyse par cytométrie sur sang total.****1- Echantillons sanguins.**

Les échantillons sanguins utilisés pour l'étude de corrélation ont été  
5 obtenus de l'Hôpital La Conception (Marseille, France). La formulation  
sanguine a été réalisée sur des tubes contenant de l'EDTA comme  
anticoagulant avec un appareil STKS-Coulter, Miami, USA. Le sang utilisé pour  
les activations des basophiles a été prélevé sur des tubes héparinés. Ces  
échantillons ont été prélevés sur des personnes appartenant au laboratoire.

10

**2- Protocole.**

L'expression du RIL-5 dans différentes sous populations cellulaires,  
à partir de sang total, a été analysée à l'aide d'un double immunomarquage,  
utilisant d'une part l'anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la phycocyanine  
15 préparé au stade 3 de l'exemple 1 et d'autre part des marqueurs spécifiques  
des populations cellulaires étudiées.

Le protocole utilisé est le suivant : 100 µl de sang total sont incubés  
avec 20 µl d'anticorps anti-RIL-5 H17N-PE et 20 µl d'un deuxième anticorps  
spécifique d'un autre marqueur. L'échantillon est incubé 15 min. à température  
20 ambiante.

Ensuite, 1 ml de réactif de lyse est ajouté et le mélange réactionnel  
vigoureusement mélangé immédiatement. Quand l'échantillon est devenu  
translucide (< 1 min.), 250 µl de réactif de fixation sont ajoutés et l'échantillon  
est à nouveau soigneusement mélangé. Trois ml de tampon phosphate  
25 isotonique (PBS 1X) sont alors ajoutés, puis l'échantillon est centrifugé pendant  
3 minutes à 1200 tours par minute. Le surnageant est aspiré et 500 µl de PBS-  
0.5% formaldéhyde sont ajoutés. Les échantillons sont stockés à 4°C et à  
l'obscurité avant l'analyse au cytomètre.

La liaison non spécifique est contrôlée en utilisant un anticorps  
30 irrelevant du même isotype référence IM 0670 (Immunotech, Marseille). Ceci  
permet d'effectuer les réglages pertinents de l'appareil. L'analyse cytométrique  
des cellules marquées par les différents fluorochromes a été réalisée sur un

appareil FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, USA). Pour chaque échantillon, on a analysé 100 000 événements.

5           3- Identification des basophiles et des éosinophiles par cytométrie de flux.

L'anticorps anti-RIL-5 H17N a été conjugué à la phycoérythrine (PE) afin de caractériser plus facilement les cellules qui expriment le récepteur de l'IL-5. L'immunomarquage du sang total avec l'anticorps H17N-PE et un anticorps de contrôle (anticorps irrelevant de même isotype référence IM 0670) 10 est montré sur la figure 1 (A et B).

En présence de l'anticorps de contrôle, on observe une absence de marquage (figure 1 A). Par contre, en présence de l'anticorps anti-RIL-5-PE, un décalage de la fluorescence de certaines cellules est observé (figure 1 B). Les deux nuages (fenêtres R5 et R4) des cellules marquées par l'anticorps anti-15 RIL-5 correspondent aux éosinophiles et basophiles. Cette observation a été confirmée grâce à plusieurs immunomarquages à l'aide d'anticorps spécifiques de différents CD's (Clusters Differentiation). Ainsi, on a observé que les cellules positives pour le RIL-5 sont négatives pour l'expression des CD3, CD19 et CD16, CDs spécifiques des lymphocytes, et négatives pour l'expression du 20 CD14, spécifique des monocytes. Cependant, les cellules sont positives pour CD49d, protéine exprimée par les éosinophiles et les basophiles, mais aussi par les lymphocytes, monocytes et thymocytes.

Ceci démontre que les cellules marquées par l'anticorps anti-RIL-5 correspondent bien aux éosinophiles et aux basophiles.

25

**EXAMPLE 3. Quantification des éosinophiles et basophiles.**

On a comparé la différence existante entre le pourcentage des éosinophiles et basophiles donné par l'hématomètre STKS (Coulter, Miami), 30 utilisé à l'Hôpital de la Conception à Marseille, et le pourcentage de cellules positives pour l'expression du RIL-5, mises en évidence par l'anticorps anti-RIL-5 H17N selon l'invention.

Les basophiles et les éosinophiles sont les seuls types cellulaires marqués par l'anticorps anti-RIL-5 selon l'invention mais le nuage des basophiles est très proche du nuage de cellules correspondant aux lymphocytes.

5 On a ajouté à l'anticorps anti-RIL-5 conjugué à la PE, un mélange d'anticorps anti-CD3, anti-CD16 et anti-CD19 conjugués au phycoérythrine Cyanine 5, ce qui permet d'exclure les événements erratiques. Cette combinaison permet d'obtenir des valeurs plus exactes. En utilisant cette méthode, on a comparé les pourcentages d'éosinophiles et de basophiles  
10 obtenus par les deux méthodes pour 50 échantillons différents. Les résultats sont présentés dans la figure 4.

La figure 4A présente la corrélation des pourcentages d'éosinophiles obtenus avec les deux techniques. Celle-ci est de  $[\% \text{ Hématimètre}] = 0,94 [\% \text{ Cytomètre}] + 0$  pour  $n = 50$ . La figure 4B présente la corrélation des  
15 pourcentages de basophiles obtenus avec les deux techniques. Celle-ci est de  $[\% \text{ Hématimètre}] = 0,86 [\% \text{ Cytomètre}] + 0,076$  pour  $n = 50$ . On observe une très bonne corrélation entre les deux méthodes,  $r = 0,98$  et  $r = 0,83$ , démontrant la grande fiabilité du procédé selon l'invention.

20 **EXAMPLE 4. Activation des basophiles.**

La libération d'histamine par les basophiles activés a été réalisée sur des fractions aliquotes de 300  $\mu\text{l}$  de sang, déposées dans un tube et incubées en présence de différentes concentrations d'anti-IgE afin d'établir une courbe  
25 dose-réponse.

Les échantillons sont mélangés doucement et incubés à 37°C pendant 15 minutes. L'activation cellulaire est arrêtée par addition de 300  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate froid contenant 1mM d'EDTA. Les tubes sont centrifugés à +4°C durant 3 minutes à 1200 tours par minute. Le surnageant est récupéré  
30 pour quantifier l'histamine. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 300  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate, 1mM EDTA et 100 $\mu\text{l}$  de cette suspension cellulaire sont analysés après immunomarquage.

La quantification de l'histamine libérée a été effectuée à l'aide d'un radio-immunodosage commercial ( Référence 1659, Immunotech, Marseille, Franc ), suivant les instructions du fabriquant. L'histamine totale est 5 déterminée après lyse cellulaire par dilution de 50µl de sang dans 950 µl d'eau distillée suivie de deux cycles de congélation-décongélation. L'histamine libérée après activation cellulaire est exprimée en pourcentage d'histamine totale.

L'analyse par cytométrie de flux a été réalisée après triple marquage sur 100µl de culot cellulaire repris par du PBS, avec l'anticorps anti-RIL-5 10 H17N-PE, l'anticorps anti-CD63-FITC et des anticorps anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, tous trois conjugués au PE Cy5. La procédure est identique à celle décrite précédemment. De la même façon, l'analyse de 100 000 cellules est acquise. Le pourcentage de cellules doublement marquées CD63+ et RIL-5+ a été déterminé après activation cellulaire.

15 Une expérience représentative est présentée sur la figure 5. On observe une augmentation de cellules doublement marquées (CD63 et RIL-5) en fonction de la concentration d'anti-IgE. Cette augmentation est parfaitement corrélée avec le profil d'histamine libérée comme cela est montré pour quatre donneurs différents sur la figure 6.

20

#### **EXAMPLE 5 . Activation des éosinophiles**

L'expression du marqueur d'activation CD69 a été réalisée sur des fractions aliquotes de 300 µl de sang, déposées dans un tube et incubées en présence de différentes concentrations de PMA (Phorbol Myristate Acetate) 25 afin d'établir une courbe dose-réponse. Les échantillons sont mélangés doucement et incubés à 37°C pendant 6 heures. L'activation cellulaire est arrêtée en centrifugeant à +4°C durant 3 minutes à 1200 tours par minute. Le surnageant est récupéré pour quantifier l'histamine. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 300 µl de PBS, 1 mM EDTA et 100 µl de cette suspension 30 cellulaire sont analysés après immunomarquage.

La quantification de l'histamine libérée a été effectuée à l'aide d'un radioimmunodosage commercial (référence 1659, Immunotech, Marseille,

France), suivant les instructions du fabricant. L'histamine totale est déterminée après lyse cellulaire par dilution de 50 µl de sang dans 950 µl d'eau distillée suivie de deux cycles de congélation-décongélation. L'histamine libérée après activation cellulaire est exprimée en pourcentage d'histamine totale.

5           L'analyse par cytométrie de flux a été réalisée après triple marquage sur 100 µl de culot cellulaire repris par du PBS, avec l'anticorps anti-RIL-5 H17N-PE, l'anticorps anti-CD69-FITC ou l'anticorps anti-CD63-FITC et les anticorps anti-CD3, anti-CD16, anti-CD19, tous trois conjugués au PEcy5. La procédure est identique à celle décrite précédemment. De la même façon,  
10 l'analyse de 100.000 cellules est acquise. Le pourcentage de cellules doublement marquées CD69<sup>+</sup> et RIL-5<sup>+</sup> d'une part, CD63<sup>+</sup> et IL-5R<sup>+</sup> d'autre part a été déterminé après activation cellulaire.

Une expérience représentative est présentée sur la figure 7. On observe une augmentation de cellules doublement marquées (CD69<sup>+</sup> et RIL-5<sup>+</sup>)  
15 en fonction de la concentration de PMA. De façon intéressante le marquage avec l'anticorps anti-CD63 sur les éosinophiles n'a pas donné de fluorescence démontrant que le CD63 est spécifique des basophiles.

**EXAMPLE 6. Kit de détection ou de quantification des  
20 éosinophiles ou des basophiles.**

On a préparé un kit répondant à la composition :

- un flacon contenant un anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la phycoérythrine
- un flacon contenant un mélange d'anticorps :
  - 25           Anti-CD3 conjugué au PEcy5
  - Anti-CD16 conjugué au PEcy5
  - Anti-CD19 conjugué au PEcy5
- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué à la phycoérythrine
- 30           - un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au PEcy5

**EXEMPLE 7. Kit de détection ou de quantification des éosinophiles ou des basophiles activés.**

On a préparé un kit répondant à la composition :

- un flacon contenant un anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la

5 phycoérythrine

- un flacon contenant un mélange d'anticorps :

Anti-CD3 conjugué au PECy5

Anti-CD16 conjugué au PECy5

Anti-CD19 conjugué au PECy5

10 - un flacon contenant un anticorps Anti-CD63 conjugué au FITC

- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué à la phycoérythrine

- un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au PECy5

15 - un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au FITC

**EXEMPLE 8. Kit de détection ou de quantification des éosinophiles ou des basophiles**

20 On a préparé un kit répondant à la composition :

- un flacon contenant un anticorps anti-RIL-5 H17N conjugué à la phycoérythrine

- un flacon contenant un mélange d'anticorps :

Anti-CD3 conjugué au PECy5

Anti-CD16 conjugué au PECy5

Anti-CD19 conjugué au PECy5

25 - un flacon contenant un anticorps « contrôle isotypique » conjugué au PECy5

- un flacon contenant du diacétate de dichlorofluorescéine

30

REVENDICATIONS

1. Un procédé pour la détection ou la quantification des éosinophiles et des basophiles, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon contenant éventuellement lesdits éosinophiles ou basophiles avec un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 (chaîne alpha) qui n'interfère pas avec la fixation de l'IL5 à son récepteur et qui n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5 pour détecter et si désiré procéder à la quantification des éosinophiles et des basophiles.
- 10 2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec les IgE
- 15 3. Un procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps qui n'interfère pas avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles.
4. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la détection et si désiré la quantification des éosinophiles ou des basophiles utilise un cytomètre de flux ou à balayage optique.
- 20 5. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que en outre l'on met en contact l'échantillon avec d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres marqueurs des types cellulaires éosinophile ou basophile.
- 25 6. Un procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que les autres anticorps monoclonaux sont dirigés contre les marqueurs CD3, CD16 et CD19.
7. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des basophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs d'activation des basophiles.
- 30 8. Un procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le marqueur d'activation est l'antigène CD 63.

9. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'on procède à la détection ou la quantification des éosinophiles activés en mettant en outre en contact l'échantillon avec un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs d'activation des éosinophiles.

5 10. Un procédé de détection et de quantification des éosinophiles activés selon la revendication 9 caractérisé en ce que le marqueur d'activation est l'antigène CD 69.

11. Un anticorps anti-RIL-5 caractérisé par :

- l'absence d'interférence avec la fixation de l'IL5 à son récepteur

10 - l'absence d'interférence avec les IgE  
- l'absence d'interférence avec l'activation cellulaire des éosinophiles ou des basophiles

- l'absence d'inhibition de l'activité biologique de l'IL-5.

12. Un kit pour la détection ou la quantification des éosinophiles et 15 des basophiles contenant

- un anticorps monoclonal anti-RIL-5 selon la revendication 11 couplé à un premier fluorochrome,  
- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome.

20 13. Un kit pour la détection et la quantification des éosinophiles et des basophiles activés contenant

- un anticorps monoclonal anti-RIL-5 selon la revendication 11 couplé à un premier fluorochrome,  
- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et 25 neutrophiles, couplés à un deuxième fluorochrome et  
- des anticorps dirigés contre des marqueurs d'activation et couplés à un troisième fluorochrome.

14. Un kit pour la détection ou la quantification de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles contenant

30 - anticorps monoclonal anti-RIL-5 selon la revendication 11 couplé à un premier fluorochrome

- un mélange d'anticorps marqueurs des lymphocytes, monocytes et neutrophiles conjugués à un second fluorochrome

- un substrat marqueur de l'activité oxydative des éosinophiles ou des basophiles.

5 15 Un kit selon l'une des revendications 12 à 14 appliqué à l'étude de pathologies allergiques, parasitaires et leucémiques.

16. Un procédé, anticorps ou kit selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-5 est un anticorps de type IgG1 dont l'hybridome correspondant a été déposé à la  
10 Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) sous le N° I-2068.

1 / 9

ISOTYPIC CONTROL IgG1 PE

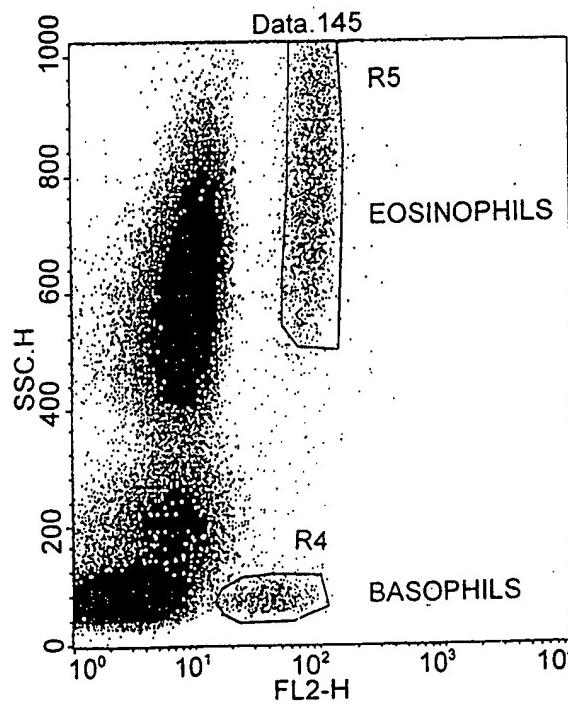
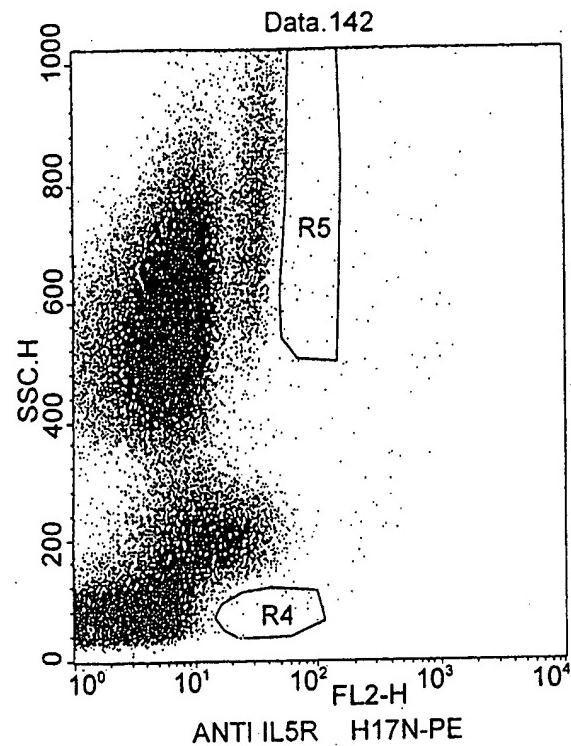


Fig. 1

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

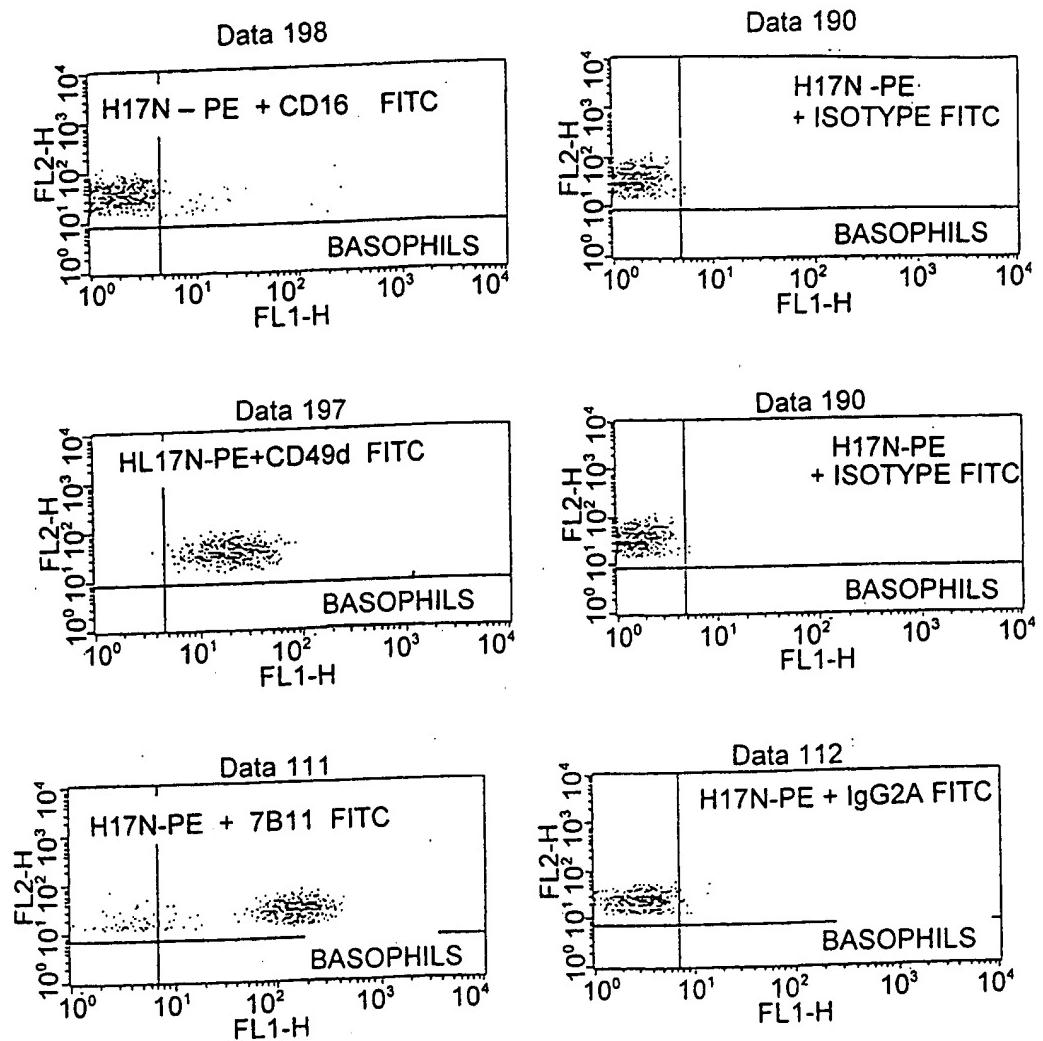


Fig. 2A

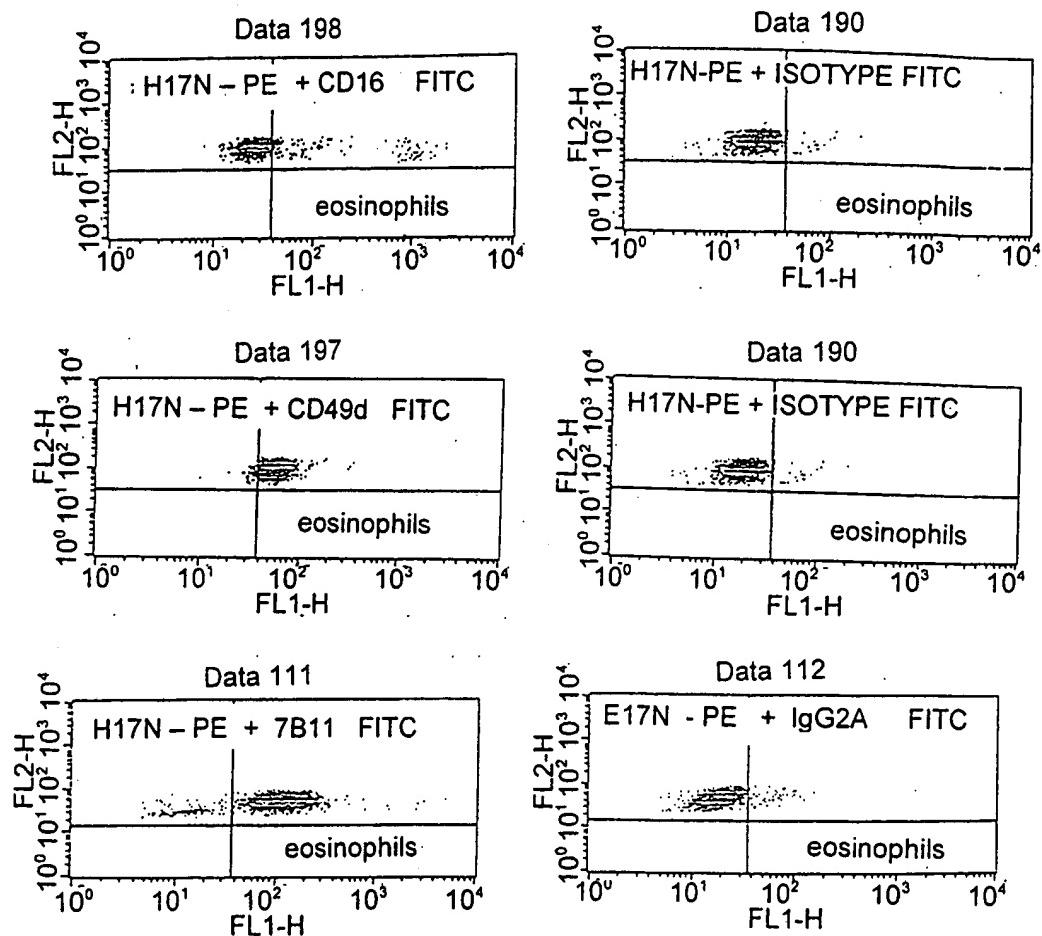
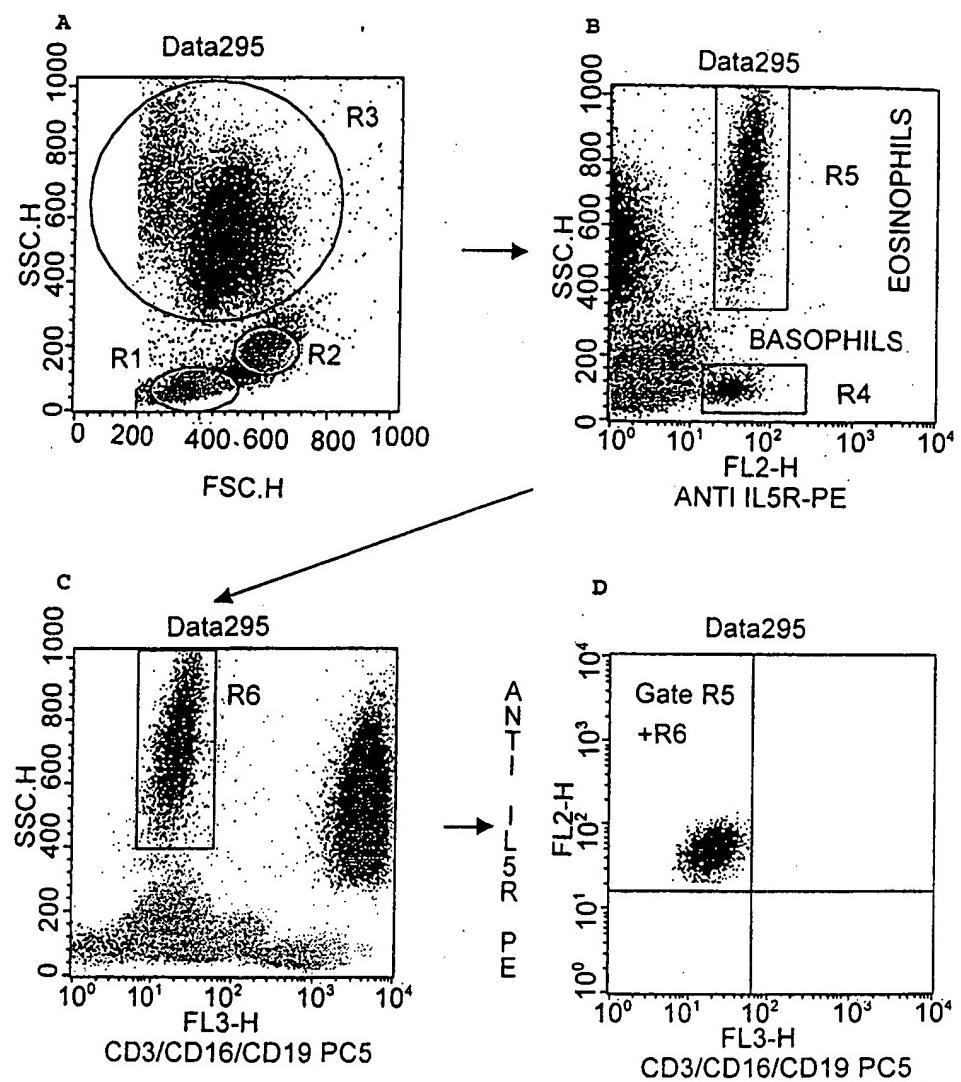


Fig. 2 B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

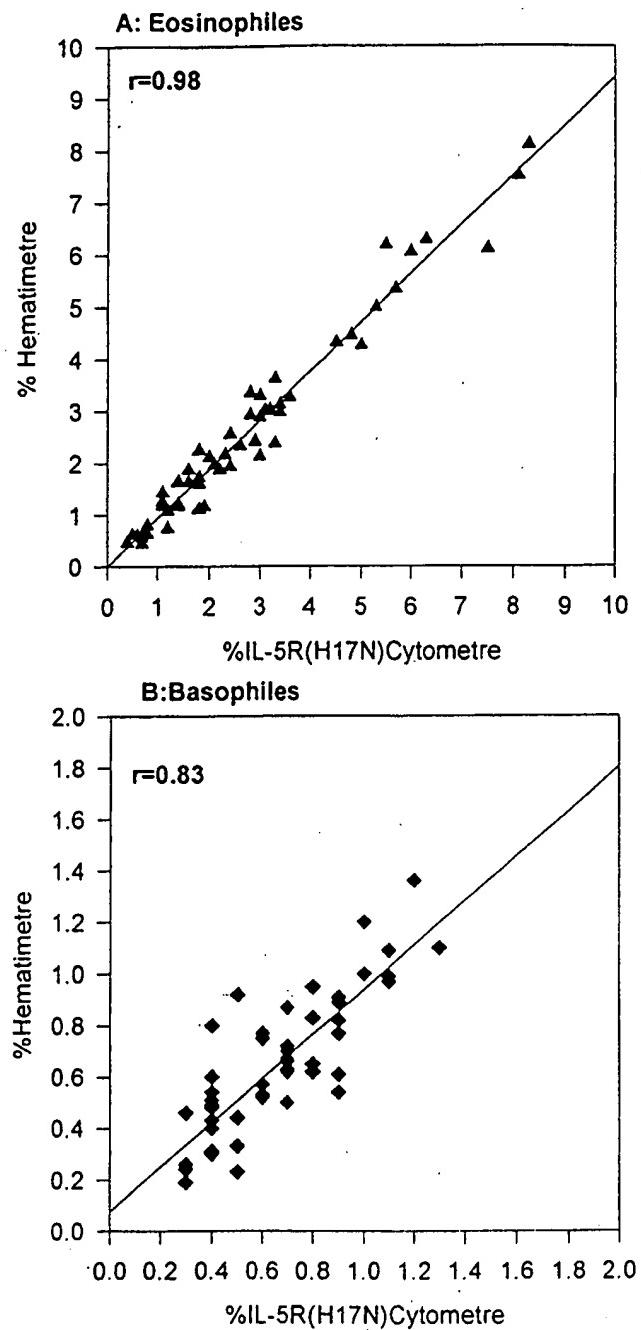


Fig. 4

6 / 9

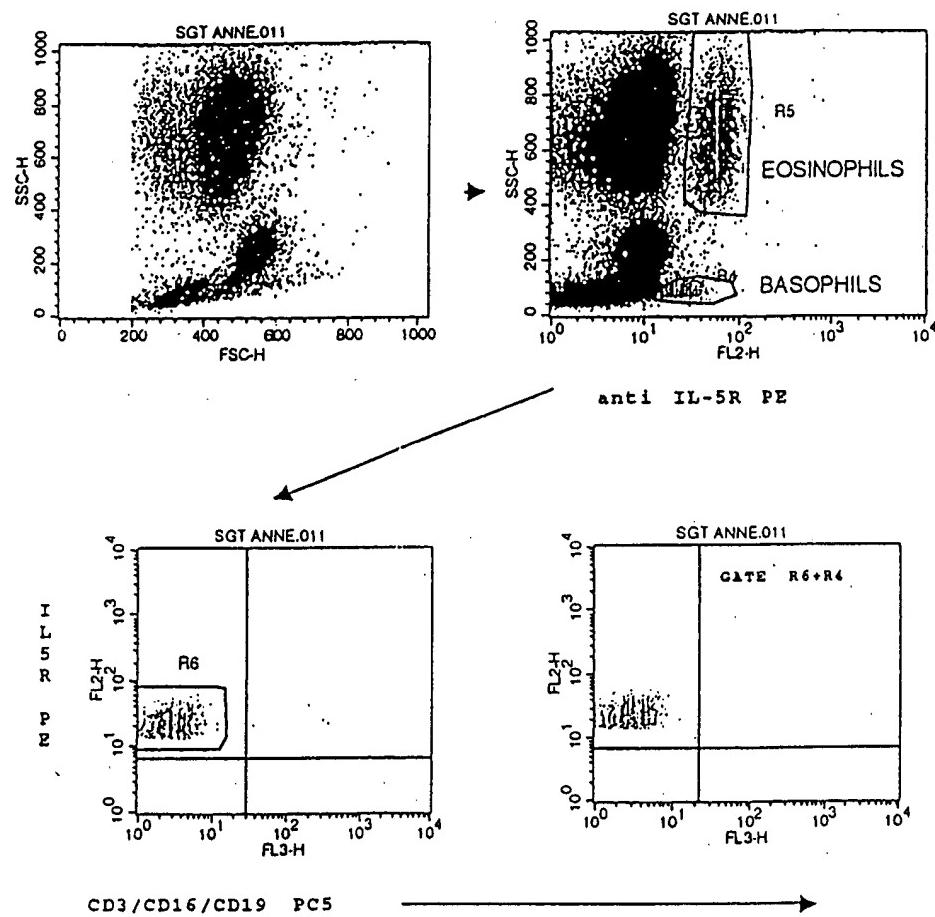
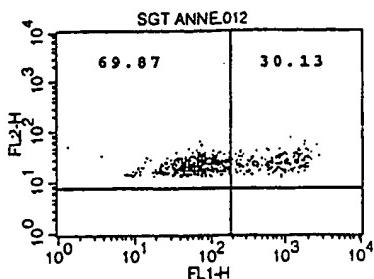
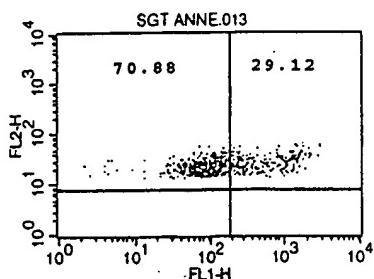


Fig. 5 A

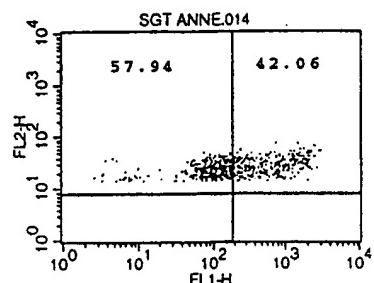
719



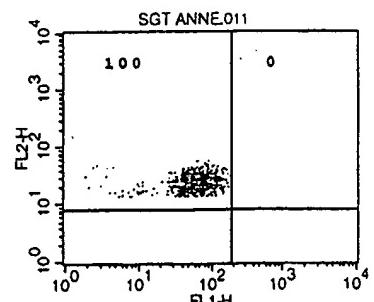
10μg/ml anti IgE



1 µg/ml anti IgE



0.1 µg/ml anti IgE



0 ug/ml anti IgE

**CD63 FITC**

Fig. 5 B

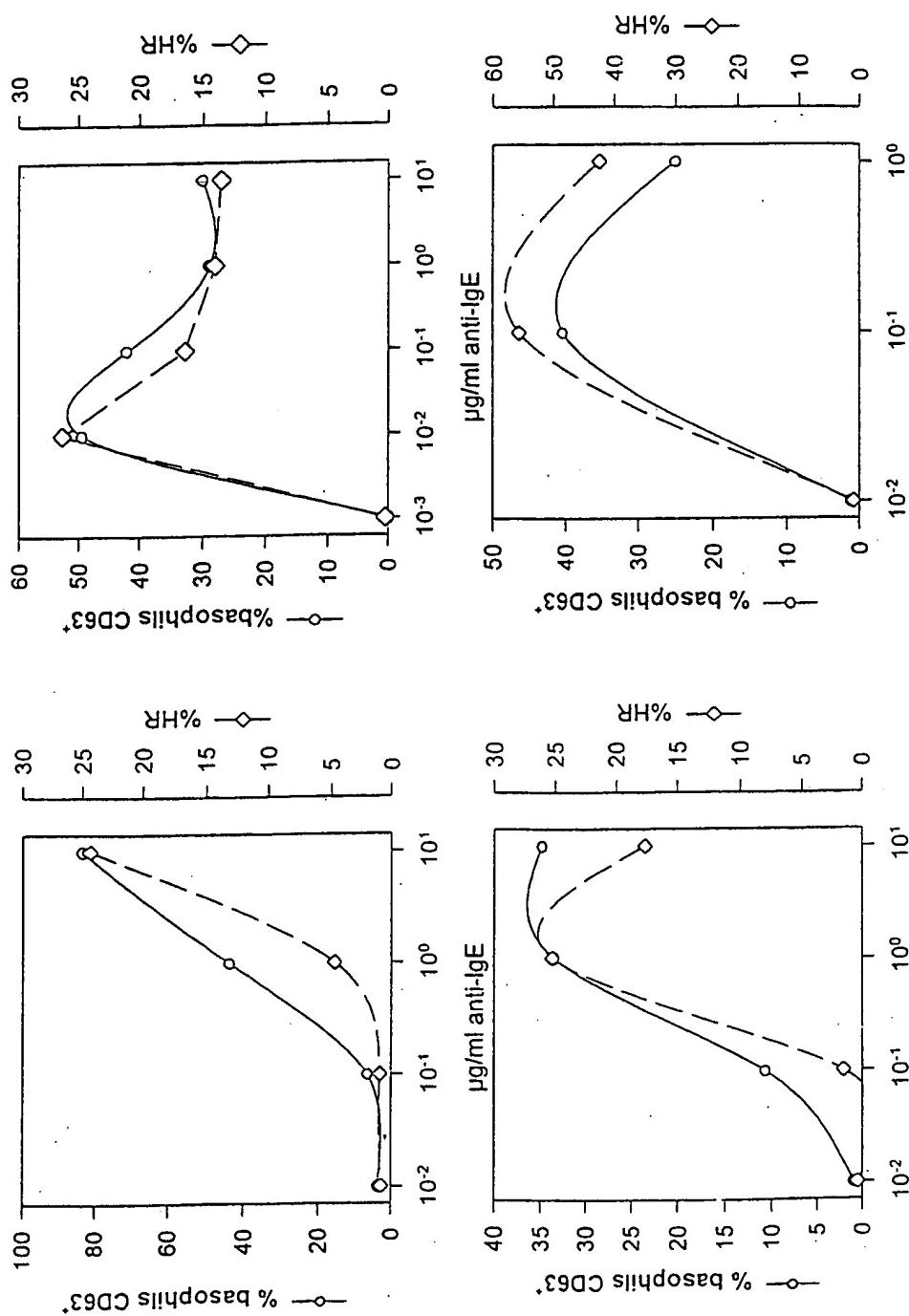


Fig. 6

9 / 9

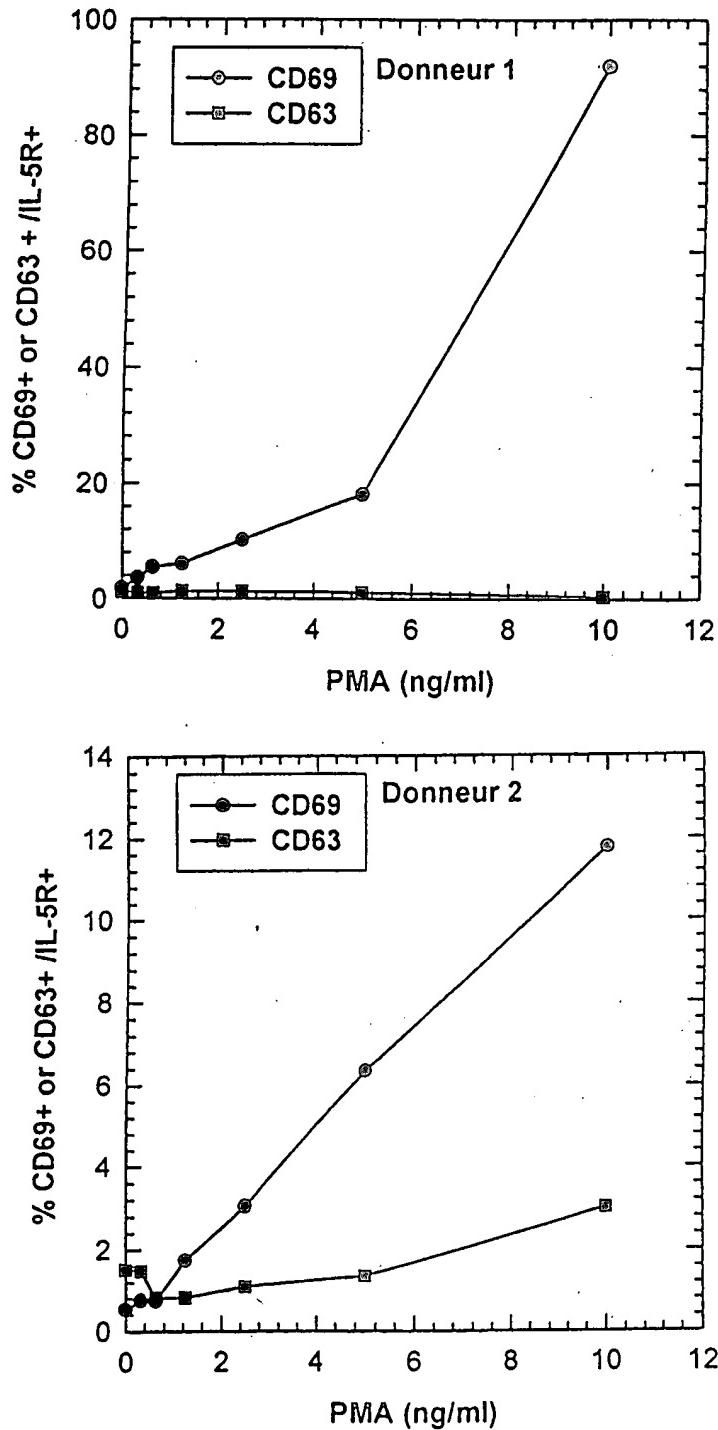


Fig. 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 99/02145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N33/68 G01N33/566 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 811 691 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 10 December 1997 (1997-12-10) the whole document ---	1-16
A	US 5 096 704 A (COFFMAN ROBERT L ET AL) 17 March 1992 (1992-03-17) examples ---	1,11-14
A	WO 97 48418 A (APPELBAUM EDWARD ROBERT ;COOK RICHARD MURRAY (US); SMITHKLINE BEEC) 24 December 1997 (1997-12-24) the whole document ---	1,11-14

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

15 November 1999

25/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr	Application No
PC	99/02145

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUN, QIYU ET AL: "Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor alpha-chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist." BLOOD, (1996) VOL. 87, NO. 1, PP. 83-92. ISSN: 0006-4971., XP002105606 abstract -----	1,11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

Int'l Application No  
PCT/US99/02145

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0811691	A	10-12-1997		AU 690474 B AU 6943896 A CA 2205007 A WO 9710354 A	23-04-1998 01-04-1997 20-03-1997 20-03-1997
US 5096704	A	17-03-1992		AT 98872 T AU 633034 B AU 4644889 A CA 2002144 A DE 68911653 D DE 68911653 T DK 81691 A EP 0367596 A EP 0441891 A ES 2062032 T HK 186196 A IE 63063 B IL 92180 A JP 7000563 B JP 3505211 T KR 9602183 B NZ 243939 A PH 26476 A WO 9004979 A	15-01-1994 21-01-1993 28-05-1990 03-05-1990 10-02-1994 07-04-1994 02-05-1991 09-05-1990 21-08-1991 16-12-1994 11-10-1996 22-03-1995 15-04-1997 11-01-1995 14-11-1991 13-02-1996 27-07-1997 27-07-1992 17-05-1990
WO 9748418	A	24-12-1997		US 5783184 A AU 3497097 A CA 2258515 A	21-07-1998 07-01-1998 24-12-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No.  
PC. N° 99/02145

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N33/68 G01N33/566 C07K16/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 811 691 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 10 décembre 1997 (1997-12-10) le document en entier ---	1-16
A	US 5 096 704 A (COFFMAN ROBERT L ET AL) 17 mars 1992 (1992-03-17) exemples ---	1,11-14
A	WO 97 48418 A (APPELBAUM EDWARD ROBERT ;COOK RICHARD MURRAY (US); SMITHKLINE BEEC) 24 décembre 1997 (1997-12-24) le document en entier ---	1,11-14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiqué)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15 novembre 1999

25/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demr	ternationale No
PCT	X 99/02145

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SUN, QIYU ET AL: "Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor alpha-chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist."</p> <p>BLOOD, (1996) VOL. 87, NO. 1, PP. 83-92.</p> <p>ISSN: 0006-4971., XP002105606 abrégé -----</p>	1,11

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux

familles de brevets

Document brevet cité	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
----------------------	---------------------	--------------------------------------	---------------------

Document brevet cité

Internationale No

PCT/FR 99/02145

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0811691 A	10-12-1997	AU 690474 B AU 6943896 A CA 2205007 A WO 9710354 A	23-04-1998 01-04-1997 20-03-1997 20-03-1997
US 5096704 A	17-03-1992	AT 98872 T AU 633034 B AU 4644889 A CA 2002144 A DE 68911653 D DE 68911653 T DK 81691 A EP 0367596 A EP 0441891 A ES 2062032 T HK 186196 A IE 63063 B IL 92180 A JP 7000563 B JP 3505211 T KR 9602183 B NZ 243939 A PH 26476 A WO 9004979 A	15-01-1994 21-01-1993 28-05-1990 03-05-1990 10-02-1994 07-04-1994 02-05-1991 09-05-1990 21-08-1991 16-12-1994 11-10-1996 22-03-1995 15-04-1997 11-01-1995 14-11-1991 13-02-1996 27-07-1997 27-07-1992 17-05-1990
WO 9748418 A	24-12-1997	US 5783184 A AU 3497097 A CA 2258515 A	21-07-1998 07-01-1998 24-12-1997

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE PROPRIETES VERTUELS



PCT



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>BIF 22038 PCT</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 02145</b>	Date du dépôt international ( <i>jour/mois/année</i> ) <b>09/09/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) ( <i>jour/mois/année</i> )) <b>10/09/1998</b>
Déposant <b>IMMUNOTECH et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

### 1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
  - la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
  - contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
  - déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
  - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
  - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
  - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
  - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

- 2.  Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
- 3.  Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

### 4. En ce qui concerne le titre,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

### 5. En ce qui concerne l'abrégé,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

### 6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

1

Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/02145

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N33/68 G01N33/566 C07K16/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 811 691 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 10 décembre 1997 (1997-12-10) le document en entier ---	1-16
A	US 5 096 704 A (COFFMAN ROBERT L ET AL) 17 mars 1992 (1992-03-17) exemples ---	1, 11-14
A	WO 97 48418 A (APPELBAUM EDWARD ROBERT ; COOK RICHARD MURRAY (US); SMITHKLINE BEEC) 24 décembre 1997 (1997-12-24) le document en entier --- -/-	1, 11-14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 novembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande Internationale No

PCT/FR 99/02145

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SUN, QIYU ET AL: "Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor alpha-chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist." BLOOD, (1996) VOL. 87, NO. 1, PP. 83-92. ISSN: 0006-4971., XP002105606 abrégé -----	1,11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0811691	A 10-12-1997	AU 690474	B	23-04-1998
		AU 6943896	A	01-04-1997
		CA 2205007	A	20-03-1997
		WO 9710354	A	20-03-1997
US 5096704	A 17-03-1992	AT 98872	T	15-01-1994
		AU 633034	B	21-01-1993
		AU 4644889	A	28-05-1990
		CA 2002144	A	03-05-1990
		DE 68911653	D	10-02-1994
		DE 68911653	T	07-04-1994
		DK 81691	A	02-05-1991
		EP 0367596	A	09-05-1990
		EP 0441891	A	21-08-1991
		ES 2062032	T	16-12-1994
		HK 186196	A	11-10-1996
		IE 63063	B	22-03-1995
		IL 92180	A	15-04-1997
		JP 7000563	B	11-01-1995
		JP 3505211	T	14-11-1991
		KR 9602183	B	13-02-1996
		NZ 243939	A	27-07-1997
		PH 26476	A	27-07-1992
		WO 9004979	A	17-05-1990
WO 9748418	A 24-12-1997	US 5783184	A	21-07-1998
		AU 3497097	A	07-01-1998
		CA 2258515	A	24-12-1997

47  
091787006  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>BIF 22038 PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. <b>PCT/FR99/02145</b>	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) <b>09 September 1999 (09.09.99)</b>	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) <b>10 September 1998 (10.09.98)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>G01N 33/68</b>		
Applicant <b>IMMUNOTECH</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>06 April 2000 (06.04.00)</b>	Date of completion of this report <b>23 June 2000 (23.06.2000)</b>
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02145

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-18, as originally filed,

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

 the claims, Nos. 1-16, as originally filed,

Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

 the drawings, sheets/fig 1/9-9/9, as originally filed,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 99/02145

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Reference is made to the following document:

D1: EP-A-0 811 691

Document D1, considered to be the prior art closest to the subject matter of Claims 1 and 11-14, describes a method for detecting eosinophils that involves monoclonal anti-IL-5R $\alpha$  antibodies blocking the biological activity of IL-5 (cf. page 2, lines 26-37; page 7, lines 47-49; page 13, lines 39-51; page 47, lines 30-59 and Claims 1-5).

Therefore the subject matter of Claims 1 and 11-14 differs from said known antibodies and said known method in that the anti-IL-5R monoclonal antibody used in the present application:

- does not interfere with the binding of IL-5 to its receptor, and
- does not inhibit the biological activity of IL-5.

Therefore the subject matter of Claims 1 and 11-14 is novel (PCT Article 33(2)).

The problem that the present application aims to solve can therefore be considered to be that of finding other

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/FR 99/02145

antibodies enabling the specific and accurate detection or quantification of eosinophils and basophils.

The solution proposed in Claims 1 and 11-14 of the present application is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)) since a person skilled in the art would not have found any indication in the known prior art leading said person to obtain and use said antibodies.

Claims 2-10 and 15 and 16 are dependent on Claims 1, 12-14 and 1-15 respectively, and therefore also, as such, fulfil the requirements of the PCT concerning novelty and inventive step.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 99/02145

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The terms and expressions placed between parentheses are considered to be entirely optional, whereas "alpha chain" is an essential feature of the invention (cf. page 4, line 9).

Since independent Claims 1 and 11 do not contain this feature, they do not fulfil the requirements of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3(b), according to which an independent claim should contain all the technical features essential to the definition of the invention.

2. Claims 13 and 14 should be dependent on Claim 12 since their subject matter contains all the features thereof. Given that Claims 13 and 14 have been drafted as separate independent claims, they are not concise and do not, therefore, fulfil the requirements of PCT Article 6.
3. Claim 16 does not fulfil the requirements of PCT Article 6, since the subject matter and the category of said claim are unclear (cf. PCT Guidelines Ch. III, 3.1). Likewise, the dependency of said claim is unclear, since it refers to three different categories.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

**PCT**

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BIF 22038 PCT	<b>POUR SUITE A DONNER</b>		voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR99/02145	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09/09/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 10/09/1998	
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N33/68			
Déposant IMMUNOTECH et al.			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I    <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II    <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III    <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV    <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V    <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI    <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII    <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII    <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>			

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06/04/2000	Date d'achèvement du présent rapport 23.06.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé  Stricker, J-E  N° de téléphone +49 89 2399 8395



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02145

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-18                   version initiale

**Revendications, N°:**

1-16                   version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/9-9/9               version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description,      pages :
- des revendications,    n°s :
- des dessins,            feuilles :

3.  Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

0071-02-28-02

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02145

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16 Non : Revendications aucune
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16 Non : Revendications aucune
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16 Non : Revendications aucune

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**Section V**

Il est fait référence au document suivant:

D1: EP-A-0 811 691

Le document D1, qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet des revendications 1 et 11-14, décrit un procédé de détection des éosinophiles qui utilise des anticorps monoclonaux anti-IL-5R $\alpha$  bloquant l'activité biologique de l'IL-5 (cf. p.2, I.26-37; p.7, I.47-49; p.13, I.39-51; p.47, I.30-59 et les revendications 1-5).

L'objet des revendications 1 et 11-14 diffère donc de ces anticorps et de cette méthode connus en ce que l'anticorps monoclonal anti-IL-5R utilisé dans la présente demande

- n'interfère pas avec la fixation de l'IL-5 à son récepteur, et
- n'inhibe pas l'activité biologique de l'IL-5.

L'objet des revendications 1 et 11-14 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la recherche d'autres anticorps permettant de détecter ou quantifier les éosinophiles et des basophiles de manière spécifique et exacte.

La solution de ce problème proposée dans les revendications 1 et 11-14 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (article 33(3) PCT) car l'homme du métier n'aurait trouvé aucune indication dans l'état antérieur de la technique connu qui l'aurait conduit à obtenir et utiliser de tels anticorps.

Les revendications 2-10 et 15, 16 dépendent respectivement des revendications 1, 12-14 et 1-15 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

## Section VIII

1. Les termes et expressions entre parenthèses sont considérés comme entièrement facultatifs or "chaîne alpha" est une caractéristique essentielle de l'invention (cf. p.4, I.9).  
Les revendications indépendantes 1 et 11 ne contenant pas cette caractéristique, elles ne remplissent pas la condition visée à l'article 6 PCT en combinaison avec la règle 6.3 b) PCT, qui prévoient qu'une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention.
2. Les revendications 13 et 14 devraient être dépendantes de la revendication 12 car leur objet en possède toutes les caractéristiques. Etant donné que les revendications 13 et 14 ont été rédigées sous forme de revendications indépendantes distinctes, elles ne sont pas concises et ne satisfont donc pas aux conditions requises à l'article 6 PCT.
3. La revendication 16 ne satisfait pas aux conditions requises à l'Art. 6 PCT car l'objet et la catégorie de cette revendication ne sont pas clairs (cf. les Directives PCT, Chap. III-3.1). La dépendance de cette revendication n'est pas claire non plus puisqu'elle se réfère à trois catégories différentes.